Aus der Medizinischen Universitätsklinik zu Göttingen
Direktor: Professor Dr. Straub †

Bleianämie als Test für den Antiperniciosa-Stoff der Leber

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität
zu Göttingen

vorgelegt am 6. 2. 1939
von

Elisabeth Hölscher
aus Hannover

GÖTTINGEN 1940

BUCHDRUCKEREI FERDINAND PIEPER / WEENDE-GÖTTINGEN

Dekan: Prof. Dr. Krantz
Berichterstatter: Doz. Dr. H. J. Wolf
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martius

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 1939

Die Leber enthält wahrscheinlich verschiedene antianämisch wirksame Stoffe. Außer den von Whipple näher untersuchten Stoff, der bei „sekundären" Anämien wirkt und den Hb-Aufbau fördert, kennt man seit neuerer Zeit weitere Stoffe, die ebenfalls bei „sekundären" Anämien antianämisch wirken. Es sind dies die Pterine und das Tyrosin, die beide bei Diätanämien ein Ansteigen der Reticulocyten und der Erythrocyten bewirken.

Grundverschieden von diesen Hb-Aufbaustoffen ist eine andere Substanz in der Leber. Sie ist bei den „sekundären" Anämien unwirksam, zeigt aber eine ganz spezifische Heilkraft bei perniciöser Anämie. Dieser sogenannte Antiperniciosastoff dient wahrscheinlich weniger dem Hb-Aufbau als der Zellbildung im Knochenmark und der Ausschwemmung aus demselben. Die Blutbildung zeigt nach Ehrlich einen Rückschlag in das frühembryonale Stadium. Diese Anschauung stützt sich auf das Auftreten von Megalocyten und Megaloblasten im Knochenmark und im strömenden Blut. Physiologischerweise hat man sie sonst nur in frühembryonalen Entwicklungsstufen gefunden. Nach anderen Untersuchungen ist diese Ansicht nicht haltbar. Schulten hält die Megaloblasten- und Megalocytenbildung bei perniciöser Anämie für eine charakteristische Reifungsstörung, für eine Abartung in der Zellbildung, so daß keine reiferen Formen aus diesen abgearteten entstehen können. Es besteht somit eine Reifungssperre im Knochenmark. Außer dem Auftreten von Megaloblasten fällt eine Unmenge von Proerythroblasten, dagegen eine Verminderung der Normoblasten auf. Das rote Knochenmark nimmt an Ausdehnung zu, das gelbe Fettmark wird zum Teil wieder in aktives rotes Mark umgewandelt. Trotz der Hyperplasie werden nur wenige Zellen ausgeschwemmt. Das Fehlen des Antiperniciosastoffes verhindert die Ausschwemmung. Es besteht somit nicht nur, wie oben ausgeführt, eine Reifungssperre, sondern auch eine Auschwemmungssperre für die Knochenmarkzellen.

Im peripheren roten Blutbild finden sich hauptsächlich Erythrocyten, die unter sich in der Form sehr verschieden sind. Wir können Poikilocyten, Mikrocyten, Normocyten unterscheiden; und wie im Knochenmark die Megaloblasten finden wir als neue Zellform die Megalocyten, die wegen ihrer ovalen Form auch Ovalocyten genannt

werden. Im gefärbten Präparat erscheinen diese durch den vermehrten Hb-Gehalt dunkler als normale Erythrocyten. In gewissem Maße ist auch der Hb-Aufbau gestört, aber im Vergleich zur Zellbildung in geringerem Grade, so daß die ausgeschwemmten Zellen trotzdem einen höheren Färbeindex zeigen als normale Erythrocyten. Eine besondere Bedeutung haben die Reticulocyten. Sie sind vital granulierte, jugendliche Erythrocyten, die schon normalerweise in sehr verschiedenen Mengen im strömenden Blut auftreten, je nach der augenblicklichen Regenerationskraft des Knochenmarks. Bei der unbehandelten perniciösen Anämie sind sie meistens stark vermindert. Als weitere junge Formen sind die polychromatischen Erythrocyten anzusehen. Die wenigen Erythrocyten und die pathologisch gebildeten Ovalocyten, die aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden, sind auch funktionell minderwertig. Sie gehen schon nach wenigen Tagen zugrunde (nach Eppinger schon nach 2—3 Tagen). Der starke Erythrocytenzerfall äußert sich in der Hämosiderosis von Milz und Leber und in der Urobilinogenurie.

Lebergaben können diese bis dahin lebensbedrohliche Blutkrankheit vollkommen beheben: Das Knochenmark läßt wieder normale Erythrocyten heranreifen und kann wieder genügend Zellen ausschwemmen, die dann wieder eine normale Lebensdauer zeigen. Als Zeichen der Regeneration erfolgt eine Reticulocytenausschwemmung, die zunächst rasch ansteigt und dann allmählich wieder abnimmt (Reticulocytenkrise), bis schließlich die normalen Reticulocyten-Werte erreicht werden. Die im Blut vorhandenen Reticulocyten reifen dort noch nach, so daß sie bald ihre Granula verlieren.

Die Chemie des Antiperniciosastoffes kennt man noch nicht, oder zum mindesten nur teilweise; man kennt nur seine Wirkungsweise. Therapeutisch kommt Verabreichung von roher Leber in Frage oder von alkoholischen Auszügen, von denen man weiß, daß sie wirken, aber nicht, wie stark sie wirken. Als einzige Prüfungsmethode kam bis jetzt immer nur die Beobachtung der Reticulocytenkrise beim perniciosakranken Menschen in Frage; diese fällt aber bei den einzelnen Patienten ganz verschieden stark aus. Trotz vieler Versuche hat man bis jetzt keinen brauchbaren Laboratoriums- oder Tiertest gefunden. Es ist bisher nicht gelungen, beim Tier eine perniciöse Anämie auszulösen. Die experimentell hervorgerufenen verschiedensten Anämien sind in wesentlichen Punkten grundsätzlich verschieden von der perniciösen Anämie des Menschen.

Lourau, Sacy und Arthus schlagen vor, bei Kaninchen durch Injektionen von basischem Bleiazetat eine konstante Anämie hervorzurufen, die sich durch Lebergaben wieder regenerieren sollen.

Hier setzten meine Versuche ein. Ich benutzte männliche Kaninchen von ca. 2—2,5 kg Gewicht. Zunächst versuchte ich, bei den

Tieren eine konstante Anämie zu erzielen. Ich injizierte ihnen täglich in eine Ohrvene basisches Bleiazetat in wachsenden Dosen. Die Höchstdosis, die ich anwandte, betrug 3,5 ccm Bleiazetat, was 7 mg metallischem Blei entsprach. Zunächst beobachtete ich eine Zunahme der Erythrocyten, was vielleicht auf der oft beobachteten Tatsache beruht, daß kleine Mengen eines Giftes reizend wirken; dann aber nahm die Zahl der roten Blutkörperchen ab. Der Hb-Gehalt nahm von Anfang an ab (s. Kurve Nr. 45 und 140 a). Mir gelang es nicht, eine konstante Anämie zu erzielen, auch nicht, nachdem ich schon 70 mg metallisches Blei injiziert hatte. Es traten bei Auslassen der Injektionen sofort Spontanremissionen auf (s. Kurve Nr. 45).

Im roten Blutbild traten bei dauernden Injektionen von Anfang an in wechselnden Mengen Reticulocyten auf, je nach der momentanen Regenerationskraft des Knochenmarks. In einem Fall sind sie bis 226 ‰ gestiegen (s. Kurve 140 a). Außerdem fand ich basophil punktierte Erythrocyten als bekanntes, charakteristisches Merkmal bei Bleianämie. Sie sind als Anzeichen von Vergiftung zu deuten. Man findet sie besonders bei Bleianämie, sie können aber auch bei anderen Anämien vorkommen. Ganz vereinzelt konnte ich Normoblasten und wenige Poikilocyten im Blut sehen. Weitaus die größte Zahl der Erythrocyten bestand aus normal geformten und normal großen Zellen. Der Färbeindex war auf der Höhe der Anämie genau so groß wie zu Beginn der Bleiinjektionen. Die Hb-Werte sind also gleichlaufend mit der Anzahl der Erythrocyten gesunken. Das beweist, daß auch eine Störung im Hb-Stoffwechsel vorliegt.

Um das Bild der Bleianämie zu vervollständigen, untersuchte ich das Knochenmark einer Rippe bei jedem Tier. Es wurde durch subkutane Injektion von 0,04 g Morphin hydrochloric. in Dämmerschlaf versetzt und bekam außerdem an dem Operationsort eine Lokalanästhesie. Dann wurden 2 cm einer Rippe reseziert. Die Hälfte des Rippenstückes wurde zu anderweitiger Untersuchung in Formalin gehärtet, die andere Hälfte der Länge nach aufgeschnitten. Die Schnittflächen wurden dann vorsichtig auf Objektträger aufgetupft. Darauf wurden die Präparate 24 Stunden an der Luft getrocknet und dann 2 Minuten in May-Grünwald, 4 Minuten in May-Grünwald + destilliertem Wasser und dann 20 Minuten in Giemsa gefärbt. Das mikroskopische Bild ergab beim Differenzieren folgendes Bild. Als Beispiel dienen die Untersuchungen bei Tier Nr. 105. I zeigt das Ergebnis der Auszählung vor dem Beginn der Bleieinwirkung, II dasselbe nach 11 Tagen mit insgesamt 22,2 ccm Bleiazetat und III nach 25 Tagen mit 46,4 ccm Bleiazetat. Bei III ist noch zu bemerken, daß an 11 Tagen vorher je 0,5 ccm Pernämyl verabreicht wurde. Bei 3 weiteren Tieren (Nr. 25, 45, 140) waren die Ergebnisse entsprechend.

	I	II	III
Erytroc. im Blut	4,92	3,35	2,94
Hb	59 %	43 %	36 %
Färbeindex	0,6	0,6	0,6
Pro-Erythroblasten	1	15	5
Makroblasten	50	60	70
Normoblasten	213	481	395
Myeloblasten	5	10	4
Promyelocyten	15	40	54
Myelocyten	162	174	236
Metamyelocyten	99	40	33
Stabkernige	90	45	24
Segmentkernige	42	30	18
Lymphocyten	5	5	16
Monocyten	3	—	—
Retikulumzellen	297	85	141
Knoch.-Mark-Riesenz.	5	5	—
Unbestimmbar	13	10	4
Dauer der Blei-Einwirkg.	—	10 Tg.	42 Tg.
Pernämyl	—	—	5,5 ccm
metall. Blei	—	44 mg	93 mg

Die Zahlen beziehen sich jeweils auf 1000 Zellen. Wenn man nun die Knochenmarksbilder der anaemischen Tiere mit einem normalen Differenzialbild I vergleicht, so erkennt man, daß die Knochenmarkstätigkeit durch die Bleiintoxikation stark verändert ist. Die Zahl der Normoblasten wie die der Makroblasten und der Proerythroblasten steigt beträchtlich an. Es fanden sich vereinzelt Normoblasten in Kernteilung. Auch in der myeloischen Reihe zeigte sich eine stärkere Linksverschiebung: Die Myelocyten nahmen auf Kosten der reiferen Formen deutlich zu. Das Knochenmark befindet sich also in einem Reizzustand. Während die Zellen der roten Reihe außer der basophilen Tüpfelung, wie sie sich auch im strömenden Blut findet, keine Besonderheiten in ihrem Aussehen aufwiesen, waren die Zellen der myeloischen Reihe auf der Höhe der Anämie ausgesprochen schlecht färbbar, während alle anderen Zellen gut durchgefärbt waren.

Bei fast allen Tieren fand sich eine Abnahme der Retikulumzellen. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß eine absolute Vermehrung der Zellen des blutbildenden Apparates ein relatives Absinken der Werte für Retikulumzellen hervorrufen kann. Es darf nicht vergessen werden, daß es sich bei den angeführten Zahlen nur um Relativwerte handelt, die nicht auf verläßliche Absolut-Zahlen bezogen werden können. Die Differenzierung der Knochenmarksausstriche erlaubt also nur eine grobe Beurteilung der Richtung, die die Verschiebungen einnehmen. Nach Klima und Seyfried sollen die Retikulumzellen Erythrocyten phagocytieren und Eisen speichern. Das würde schon für einen Untergang im Knochenmark, als einem Teil des retikuloendothelialen Systems sprechen. Ich habe keine Einschlüsse in den Retikulumzellen beobachtet.

Nachdem ich nun die Bleianämie als solche genau untersucht hatte, stellte ich die Reaktion auf Leberpräparate fest. Ich benutzte Pernämyl und injizierte jedesmal 0,5 ccm subkutan. Zunächst bekam ein Tier auf der Höhe seiner Anämie täglich Pernämyl unter fortgehenden Bleiinjektionen. Nach 11 Tagen zeigte sich gar keine Besserung der Blutwerte, im Gegenteil: Erythrocyten und Hämoglobin nahmen noch weiter ab. Auch erfolgte keine Reticulocytenausschwemmung, was auf eine beginnende Regeneration schließen ließe (s. Kurve 105).

Darauf versuchte ich, eine Anämie dadurch zu verhindern, daß ich von Anfang an gleichzeitig mit den Bleiinjektionen Pernämyl gab. Auch das mißlang: Nach 20 Tagen zeigte das Tier eine genau so schwere Anämie wie andere Tiere ohne Pernämylgaben (s. Kurve 125). Das Knochenmarksbild zeigte keinen Unterschied zu anderen Knochenmarksbildern.

Der Mißerfolg dieser Versuche läßt sich meiner Meinung nach aus der Wesensverschiedenheit von perniciöser Anämie und Bleianämie erklären. Wie ich anfangs hervorhob, besteht bei perniciöser Anämie eine starke Veränderung im Knochenmark mit Reifungs- und Ausschwemmungssperre. Die beobachtete Hämolyse ist auf die Minderwertigkeit der pathologisch gebildeten Erythrocyten (Ovalocyten) zurückzuführen.

Das Knochenmark bei Bleianämie dagegen ist im Zustand deutlicher Mehrleistung: Es weist hauptsächlich reife Normoblasten auf, es besteht keine nachweisbare Ausschwemmungssperre, sondern nur die physiologisch vorhandene „Schranke", die keine kernhaltigen Erythroblasten ins Blut ausschwemmen läßt. Die Ursache der Bleianämie ist also nicht zentral in der Bildungsstätte der Erythrocyten zu suchen, sondern peripher in einer vermehrten Zerstörung. Die erwähnte Schranke wird sofort durch eine einmalige intravenöse Tuscheinjektion von 5 ccm bei weitergehenden Bleiinjektionen durch-

brochen. Nach der Tuscheinjektion fanden sich massenhaft Normoblasten im Blut, die bei täglicher Untersuchung bis zu 264 auf 100 Leucocyten stiegen. Nach Fortlassen der Bleiinjektion nahmen die Normoblasten im Blut schnell ab (s. Kurve 140 b). Das kann im Sinne einer stärkeren Erythropoese im Knochenmark durch die Bleiintoxikation gedeutet werden. Im Blut findet man keine sichtlichen Veränderungen, die auf eine in der Blutbahn stattfindende Hämolyse schließen ließen. Nach Naegeli gehen die Erythrocyten in dem reticuloendothelialen System unter, wofür die starke Hämosiderosis dieser Organe spricht. Als Zeichen des Untergangs der Erythrocyten führen Klima und Seyfried die phagocytierenden und speichernden Retikulumzellen an, die auch in der Milz gefunden wurden. Als weiterer Beweis für den Erythrocytenuntergang im reticuloendothelialen System dienen die Versuche von Kin, Sho, Sei, der durch Herausnahme der Milz, als einem Hauptorgan des reticuloendothelialen Systems, den raschen Ausbruch der Anämie verhindern konnte.

Im Bleiazetat haben wir demnach ein vorwiegend globulicid wirkendes Gift vor uns, das auf das Knochenmark höchstens reizend, nicht aber degenerierend wirkt. Infolgedessen können therapeutische Lebergaben, die die Reifungssperre und Ausschwemmungssperre aufheben sollen, keinen Einfluß auf die Bleianämie ausüben. Und erst recht kann natürlich die experimentelle Bleianämie keinen Test für Leberpräparate abgeben.

Besprechung.

Vorliegende Arbeit diente zur Klärung der Frage: Eignet sich die Bleianämie zum physiologischen Test für den Antiperniciosa-Stoff der Leber?

Folgende Versuche wurden angestellt: Zunächst war das Ziel, mit Bleiazetat eine konstante Anämie zu erzeugen. Das gelang nicht. Bei Auslassen der Injektionen traten sofort Spontanremissionen auf. Darauf verfolgte ich das Verhalten des Knochenmarks vor der Bleiintoxikation und auf ihrer Höhe beim selben Tier. Ich stellte fest, daß es zu einer deutlichen Veränderung im Knochenmark kam im Sinne einer starken Zunahme der Erythroblastenproduktion und einer Linksverschiebung in der myeloischen Reihe als Ausdruck des Reizzustandes, in dem sich das Knochenmark befand.

Die Bleianämie geht also mit einer starken Hyperaktivität des Knochenmarks einher. Der Schaden kann also keinesfalls am Knochenmark selbst angreifen. Es kann sich nur um eine vermehrte Zerstörung in der Peripherie handeln, auf die der Körper mit Hyperaktivität der Blutbildungsstätten reagiert.

Nachdem nun das Wesen der Bleianämie als solche untersucht worden war, wurden die Einwirkungsmöglichkeiten von Pernämyl auf die anämischen Tiere geprüft. Es stellte sich heraus, daß Pernämyl keine Einwirkung auf eine bestehende Bleianämie hatte, daß sogar bei fortwährenden Bleigaben, die zur Vermeidung von Spontanremissionen gegeben wurden, der Hb-Wert und die Zahl der Erythrocyten weiter sanken. Nicht einmal Ansätze zu einer Regeneration konnte ich aus einer Reticulocytenkrise feststellen.

Auch ließ sich das Auftreten einer Anämie durch gleichzeitiges Verabreichen von Blei und Pernämyl nicht verhindern. Das Tier bekam genau solch eine Anämie wie alle anderen, und auch das Knochenmarksbild unterschied sich nicht von denen der leberfrei behandelten Tiere.

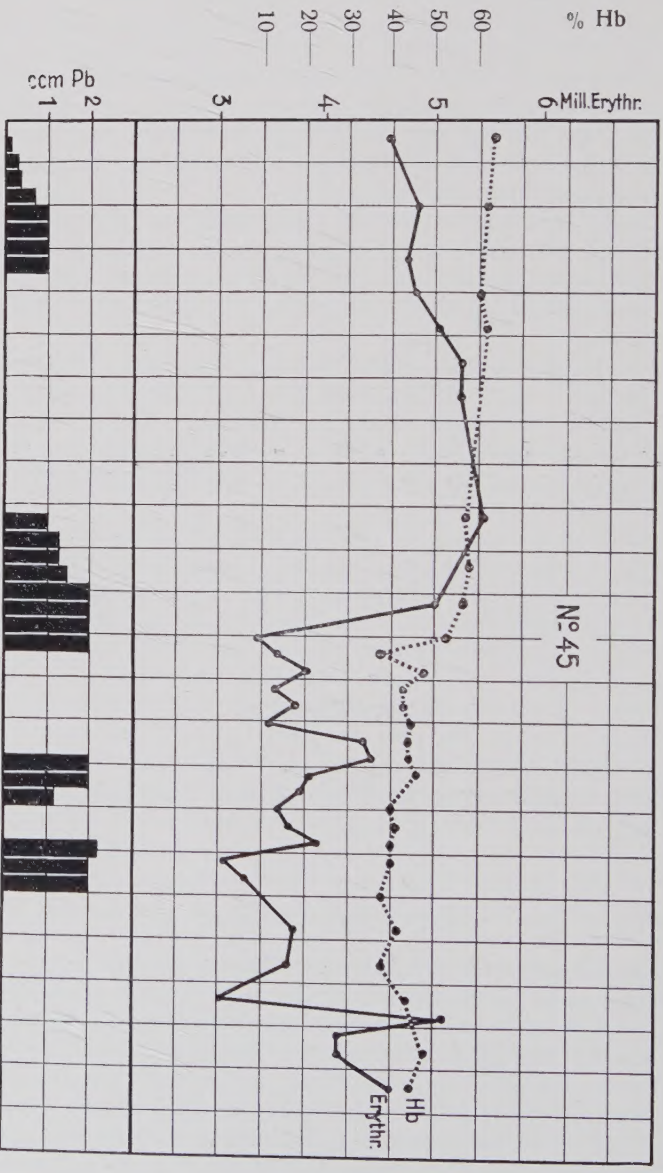
Das Versuchsergebnis entspricht eigentlich der Erwartung. Die Bleianämie ist in ihrer Pathogenese völlig verschieden von der perniciösen Anämie. Sie wird durch peripherische Einflüsse ausgelöst, während bei der perniciösen Anämie im Vordergrund eine Reifungs- und Ausschwemmungssperre steht, also ein am Knochenmark selbst angreifender Schaden.

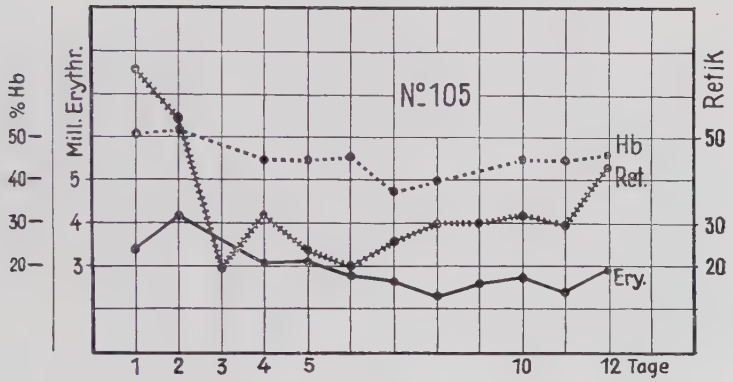
Wenn man die Zellen des Knochenmarksausstriches und die des strömenden Blutes miteinander verglich, so fand man, daß eine Ausschwemmungs-„Schranke" für kernhaltige Erythrocyten bestand, wie sie auch physiologischerweise vorhanden ist. Diese konnte durch eine einmalige Tuscheinjektion sofort aufgehoben werden.

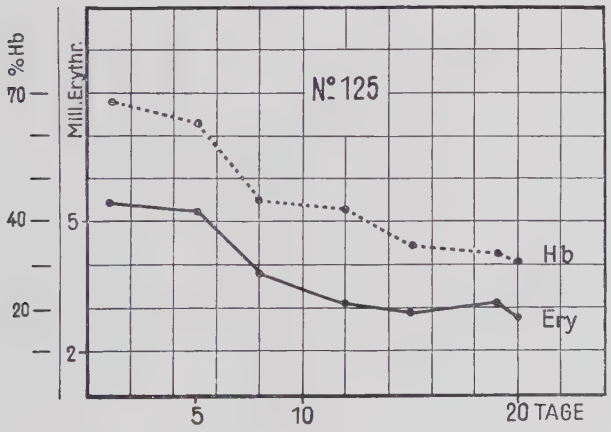
Das Bleiazetat greift auch nach den Angaben in der Literatur peripher an. Es fördert den Untergang der Erythrocyten im reticuloendothelialen System. Da aber der Antiperniciosa-Stoff der Leber die Reifungs- und Ausschwemmungssperre aufheben soll, die beide nach den obigen Ausführungen für die Bleianämie nicht zutreffen, kommt diese nicht als Test für den Antiperniciosastoff der Leberpräparate in Frage.

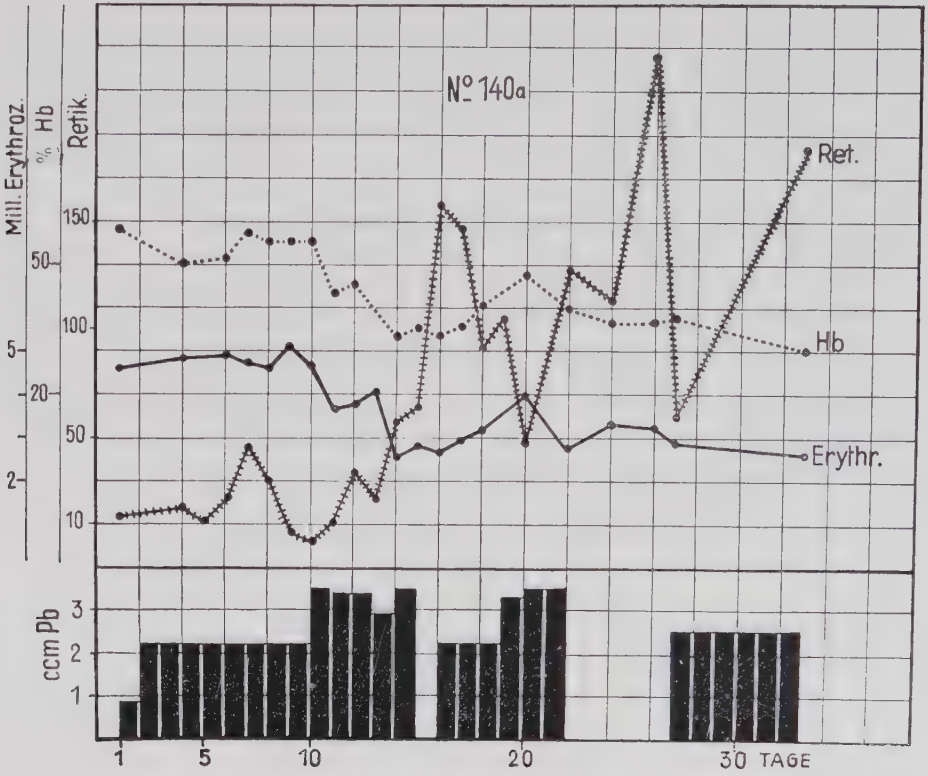
Zusammenfassung.

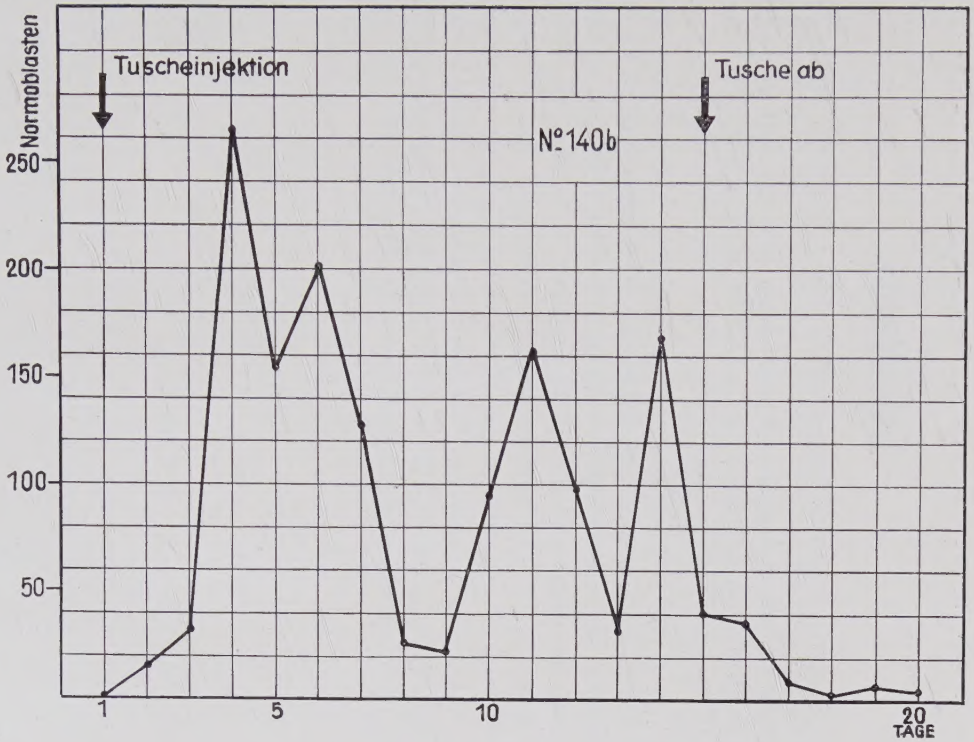
Es galt in diesen Versuchen klarzustellen, ob sich die experimentelle Bleianämie als Test für den Antiperniciosastoff eignet. Es gelang nicht, eine konstante Anämie durch Bleiintoxikation zu erzeugen. Die Knochenmarksausstriche von mit Bleiazetat anämisierten Tieren zeigten eine deutliche Hyperaktivität des Knochenmarks. Pernämyl zeigte keine Einwirkung auf eine bestehende Bleianämie, noch konnte es durch gleichzeitige Gaben von Bleiazetat eine Anämie verhüten. Bleiazetat ist ein peripher wirkendes Blutgift. Da der Antiperniciosastoff aber im Knochenmark angreift, kann die Bleianämie nicht als Test für den Antiperniciosastoff dienen.


% Hb
60
50
40
30
20
10
Mill.Erythr.
6
5
4
3
ccm Pb
2
1
Nº 45
Hb
Erythr.
5
10
20
30
40
50
60
TAGE


% Hb
Mill. Erythr.
Retik
N° 105
Hb
Ret.
Ery.
50
40
30
20
5
4
3
50
30
20
1
2
3
4
5
10
12 Tage


% Hb
Mill. Erythr.
N° 125
Hb
Ery
70
40
20
5
2
5
10
20 TAGE


Mill. Erythroz.
% Hb
Retik.
N° 140a
Ret.
Hb
Erythr.
150
50
100
5
20
50
2
10
ccm Pb
3
2
1
1
5
10
20
30 TAGE


Normoblasten
Tuscheinjektion
Tusche ab
N°140b
250
200
150
100
50
1
5
10
20
TAGE

Schrifttum.

Tschesche u. Wolf: Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem. 248, 34 (1937).
Schulten, Hans: Sternalpunktion als diagn. Methode. S. 41 (1937).
Lourau, Sacy, Arthus: Presse medicale No. 60 (1937).
Klima u. Seyfried: Fol. haemat. Lpz. 57, 286 (1935).
— Fol. haemat. Lpz. 57, 289 (1935).
Naegeli, O.: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. 5. Aufl., S. 665 (1930).
Kin, Sho, Sei: J. med. Coll. Keijo 6 (Kongreß Zentral Blatt 87, 579 (1936)).
Klima u. Seyfried: Fol. haemat. Lpz. 57, 293 (1935).

Zum Schluß meiner Arbeit möchte ich Herrn Dr. Wolf für die Anregung der Arbeit sowie deren Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf.

Am 5. 2. 1914 wurde ich als zweites Kind des damaligen Dozenten Dr. ing. Uvo Hölscher und seiner Ehefrau Katharina geb. Vogelsang in Hannover geboren. Nach 3 Vorschuljahren machte ich 1923 die Aufnahmeprüfung für die städtische Sophienschule in Hannover. Von der U III an ging ich auf die realgymnasiale Abteilung der Schule, wo ich Ostern 1933 die Reifeprüfung ablegte. Nach einem hauswirtschaftlich-praktischen halben Jahr begann ich im Herbst 1933 das Medizinstudium in Freiburg. Das Sommersemester 1934 verbrachte ich in Kiel und legte dort das Vorphysikum ab. In meinem 3. Semester kehrte ich nach Freiburg zurück, blieb dort bis zum 5. Semester, nach welchem ich die ärztliche Vorprüfung ablegte. Nach einem Ostsemester in Königsberg und einem Semester in München kam ich nach Göttingen, wo ich im Frühjahr 1939 das medizinische Staatsexamen ablegen werde.